

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-275232

(43)Date of publication of application : 30.09.1992

(51)Int.Cl. A61K 39/40
A23C 9/152
A23G 3/00
A23G 9/02
A23L 1/30
A61K 39/40

(21)Application number : 03-120693

(71)Applicant : TAIYO KAGAKU CO LTD

(22)Date of filing : 01.03.1991

(72)Inventor : TAKAHASHI HIDEHISA
AKACHI SHIGEMITSU
HATTA HAJIME
NISHIMOTO KATSUYA
KIN BUSAKU
YAMAMOTO TAKEHIKO
NAKAJIMA MUTSUYASU

(54) FOOD FOR PREVENTING GASTRITIS, GASTRIC ULCER OR DUODENAL ULCER

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a food for preventing gastritis, gastric ulcer or duodenal ulcer caused by Helicobacter pylori.

CONSTITUTION: A gastritis, gastric ulcer or duodenal ulcer-preventing food contains as an active ingredient an antibody specific to an antigen prepared from the egg of a chicken immunized with Helicobacter pylori as the antigen. When the gastritis, gastric ulcer or duodenal ulcer-preventing food is eaten, the adhesion of the Helicobacter pylori to the membrane mucosas of a gaster and a duodenum is inhibited, thereby permitting to prevent the crisis of the gastritis or duodenal ulcer caused by the Helicobacter pylori to contribute to the maintenance of health.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-275232

(43) 公開日 平成4年(1992)9月30日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/40	A C J	8413-4C		
A 2 3 C 9/152		6977-4B		
A 2 3 G 3/00		9161-4B		
9/02		9161-4B		
A 2 3 L 1/30	A	8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1(全6頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-120693

(22) 出願日 平成3年(1991)3月1日

(71) 出願人 000204181

太陽化学株式会社

三重県四日市市赤堀新町9番5号

(72) 発明者 高橋 秀久

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 赤地 重光

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 八田 一

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品

(57) 【要約】

【目的】 ヘリコバクター ピロリに起因する胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品を提供する。

【構成】 ヘリコバクター ピロリ菌体を抗原とし免疫した鶏の卵から調製した該抗原に特異的な抗体を有効成分とする胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品。

【効果】 本発明の胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品を食すれば、ヘリコバクター ピロリの胃、十二指腸粘膜への付着が抑制され、ヘリコバクター ピロリによる胃炎、胃または十二指腸潰瘍の発症を予防することができ、健康の維持に貢献する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) 菌体を抗原とし免疫した鶏の卵から調製した該抗原に特異的な抗体を有効成分とする胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヘリコバクター ピロリで免疫した鶏の卵から調製した該抗原に特異的な抗体を有効成分とする胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品に関する。

【0002】

【従来の技術】 1983年MarshallとWarrenが胃炎、胃潰瘍患者の胃生検材料からカンピロバクター ピロリが高率に検出されること (Warren J.R., Marshall B.J.: Lancet, 1273~1275, 1983) を報告して以来、胃炎、胃または十二指腸潰瘍の発症にカンピロバクター ピロリが関わっていることが次第に明らかとなってきた。尚、カンピロバクターピロリは1989年Goodwinらにより食中毒菌であるカンピロバクタージェジュニやカンピロバクター コリとは、別属であることが証明され、新しい属名を設けヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) と分類された。以下、カンピロバクター ピロリは全てヘリコバクター ピロリと読みかえる。胃潰瘍、十二指腸潰瘍の治療剤としては胃酸分泌を抑制するH₂ ブロッカーが主流であり治療効果は高いが、一旦治癒しても再発することの多いことが本疾患の特徴とされている。再発率の高い理由としては、H₂ ブロッカーを投与しても、ヘリコバクターピロリが除去されないことによると考えられている (McLean A.J., et al.: Lancet, ii: 525~526, 1984)。また、胃または十二指腸へのヘリコバクター ピロリの感染に対し、抗生物質を用いる治療も試みられているが、評価は一定でない。一方、食中毒菌、例えばサルモネラ菌やカンピロバクター菌の少ない食鳥肉を製造するための、食鳥の食中毒菌保菌抑制材料及び食鳥肉の食中毒菌抑制方法 (特開平1-93539) が提唱されている。しかし、該特許には、カンピロバクター ジェジュニが食中毒菌として例示され、食鳥の食中毒抑制材料として該菌体に対する抗体を用いることが記載されているのみで、胃炎、胃または十二指腸潰瘍との関連、あるいはその予防方法等を示唆する記載は全くない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、飲食等により摂取されるヘリコバクター ピロリの感染を抑制することにより胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍発症のリスクファクターを除くことにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは前記課題を解決するため鋭意検討した結果、ヘリコバクター ピロリで免疫した鶏に当該菌体に対する特異的な抗体すなわち抗ヘリコバクター ピロリ抗体 (特異的な抗体) が効率的に産生されること、さらに抗ヘリコバクターピロリ抗体を経口的に投与することにより、胃粘膜、十二指腸粘膜へのヘリコバクター ピロリの付着及び感染が抑制されることをはじめて見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明の要旨は、ヘリコバクター ピロリ菌体を抗原とし免疫した鶏の卵から調製した該抗原に特異的な抗体を有効成分とする胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品に関する。

【0005】 本発明に用いる抗ヘリコバクター ピロリ抗体は、予めヘリコバクター ピロリ菌体を抗原とし免疫した鶏が産生した卵から調製される。免疫に用いる鶏は産卵鶏を用いるが、特に産卵率の高い、白色レグホン系、ロードアイランドレッド系、横斑ブロマスロック系、ニューハンプシャー系等の卵用種を用いるのが好ましい。免疫方法としては、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射等、一般的な免疫方法が用いられる。

【0006】 抗原に用いるヘリコバクター ピロリ菌体はATCC (American Type Culture Collection) 43504, 43526, 43579, 43629株等の登録株の他、臨床分離株が使用できる。菌の培養は例えば、トリプトソイブイオン培地やハートインフュージョンブイオン培地に馬血液または馬血清を3~10%の濃度で混和した培地等、ヘリコバクター ピロリの培養に適した培地が使用され、5%O₂, 10%CO₂, 85%N₂ 下、37℃ 3日間等の条件で培養できる。特に、寒天培地を用いる場合は、98%以上の高温で培養することが望ましい。

【0007】 このようにして培養されたヘリコバクター ピロリ菌体は薬剤、加熱等により不活化した後、遠心して集菌され、生理的リン酸緩衝液等で洗浄した後、そのままもしくは粉碎した後、生理食塩に溶解するか、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA) 等のアジュバントと共に乳化懸濁して鶏免疫用の抗原とする。抗原の投与量は所望の抗体価が得られ、かつ鶏に対して悪影響を与えない程度の量を適宜選択すればよい。初回免疫後の追加免疫は、目的とする抗体の抗体価により、適宜決定できる。

【0008】 鶏卵中等の特異的な抗体価は、酵素免疫吸着法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ、マイクロタイター法等を用いて測定することができ、これらの方法に従って免疫後の抗体価の推移を追跡することができる。後述の実施例においては、マイクロタイター法により凝集抗体価の推移を追跡し、抗体価が十分に上昇した段階 (例えば320以上) の卵を採取して、全卵粉末、卵黄粉末、卵黄水溶性蛋白粉末及び精製鶏卵抗体をそれ

3

ぞれ調製した。

【0009】抗体の抽出、分離方法としては、例えば、デキストラン硫酸やポリエチレングリコール（PEG）、寒天、カラギナン、ファーセララン、ペクチン、キサンタンガム、アルギン酸塩、アルギン酸誘導体等を用いてリボ蛋白を沈殿させ、その上清から分離、精製する方法（Journal of Immunology Methods, 46, 63～68, 1981/Immunological Communication, 9 (5), 475～93, 1980/特開昭63-215699号/特開昭64-38098号）や、プロバノール、クロロホルム等を用いた抽出法など公知の方法が用いられるが、本発明の抗体の利用分野を考慮して、例えば食品等での利用の場合は、カラギナン、キサンタンガム、ペクチン等の食品天然添加物として認められているものを用いるのが人体への安全性の見地から好ましい。

【0010】本発明に用いる抗体は、ヘリコバクターピロリの不活化菌体を抗原とし免疫した鶏の卵から得た全卵または卵黄液をそのまま、または噴霧乾燥等通常の方法により乾燥粉末化した粉末、卵黄液をカラギナン等を用いて卵黄リボ蛋白を除去した卵黄水溶性蛋白を粉末化した卵黄水溶性蛋白粉末として、あるいは卵黄水溶性蛋白をイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過、硫酸ナトリウム塩析、硫酸アンモニウム塩析等の公知の蛋白精製方法により精製された精製鶏卵抗体として等、各種の形態、純度のものが使用できる。このようにして得られた各種調製サンプルの鶏卵抗体の純度は、粉末重量に対する鶏卵抗体重量で換算すると、卵黄粉末の形態では、鶏卵抗体が1～2%、卵黄水溶性蛋白粉末の形態では、通常8～30%、精製鶏卵抗体の形態では95%以上である。

【0011】本発明の胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品は投与形態に応じて種々の形に調製される。例えば、アイスクリーム、ヨーグルト、ショートケーキ、ガム等の冷菓、菓子類、調製粉乳、ココア、コーヒー等の粉末飲料、マーガリン、バター、チーズ、ベビーフード等の各種食品が適用される。また、胃、十二指腸の手術を受けた患者等の病院食、経口輸液等としても適用される。本発明の胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍予防食品中の鶏卵抗体の含有量は、その投与形態に応じた投与量に従って適宜選択すれば良く、鶏卵抗体として0.025～0.25重量%、好ましくは0.05重量%以上とするのが良い。

【0012】

【作用】胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍の患者の胃、十二指腸のびらん部の粘膜からヘリコバクターピロリが検出されること、潰瘍病変部の菌数が有意に高いことからこれらの疾患の発症にヘリコバクターピロリが深くかかわっていることが明らかにされてきた。ヘリコバ

4

クターピロリの胃、十二指腸への感染は、食物等と共に経口的に侵入した菌が、まず胃、十二指腸粘膜に付着することから始まる。一方、本発明に用いる抗体は、ヘリコバクターピロリの胃、十二指腸粘膜への付着を抑制することができる。例えば、豚胃粘膜ムチンを被覆したポリスチレンプレートにヘリコバクターピロリ菌体の懸濁液またはヘリコバクターピロリ菌体と当該精製鶏卵抗体の混液を添加してインキュベートし、洗浄後、プレート上に残存する菌数を測定したところ、精製鶏卵抗体を含む溶液を添加したプレート上の菌数は抗体を含まない溶液の場合の菌数の17%にまで減少した。従って、本発明の食品を食すれば、経口的にヘリコバクターピロリが侵入しても口腔内、食道、胃、十二指腸で抗体が吸着し、胃、十二指腸粘膜への菌の付着を抑制することができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例、試験例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はもとよりこれに限定されるものではない。

実施例1. <抗原の調製>ヘリコバクターピロリ臨床分離株を7%馬脱繊維血液を含むSkirrowの寒天培地で37℃、4日間培養した（10%CO₂、90%空気、加湿）。次いで生成したコロニーをかきとり生理食塩水に懸濁し、懸濁液に0.5%（v/v）となるようにホルマリンを加え、室温18時間放置し菌体の不活化処理を行った。次いで菌体を3,000×g、10分間の遠心分離で集め、生理食塩水で3回洗浄した。菌体を生理食塩水に分散させた後、ヒスコトロンで均質化し、波長660nmにおける吸光度を8.0に調製し抗原液とした。

【0014】<産卵鶏への免疫>産卵鶏（白色レグホン系）に抗原液を1羽あたり1ml筋肉注射した。免疫は毎週1回、合計4回繰り返した後、抗体価の維持を目的として、1ヶ月毎に1回の免疫を行った。

【0015】<鶏卵卵黄中の特異的抗体価の測定>鶏卵卵黄中の特異的抗体価は、マイクロタイター法により凝集抗体価を測定した。2週毎に集めた鶏卵から卵黄を分離し、該卵黄1gとλ-カラギナン水溶液（1.5%W/V）9mlを混和し、室温で30分間放置後、1,000×g、10分間の遠心分離を行い、特異的抗体を含有する卵黄水溶性蛋白画分を得、試料液とした。試料液を生理的リン酸緩衝液pH 7.4（以下PBSという）で2°倍希釈し検液とした。各検液50μlと抗原液50μlをマイクロプレート中に混合し、37℃、24時間後静置し、凝集の有無を調べた。抗原液は免疫に用いた抗原を、PBSで10倍希釈し（波長660nmにおける吸光度0.8）したものを用いた。凝集抗体価は、凝集の見られるサンプルの最大希釈倍率の逆数で示した。表1に鶏卵卵黄中特異的抗体価の推移を示す。

【0016】

【表1】

鶏卵中の凝集抗体価の検出

免 疫	免疫価の型	鶏卵中凝集抗体価
→	0	> 20
→	0	40
→	4	160
	6	1280
	8	640
	10	640
→	12	320
	14	640
	16	640
	18	320
→	20	320
	22	640
	24	1280
	26	640

【0017】＜鶏卵抗体の調製＞

(a) ヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する全卵または卵黄粉末の調製

凝集抗体価が320以上の鶏卵を割卵して得た全卵、および卵黄各1kgをホモミキサーで均質化した。それぞれの溶液を63℃、3分間の条件で殺菌を行った後、噴霧乾燥により、それぞれの粉末を調製し、ヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する全卵粉末（以下抗HP全卵粉末という）232g、および卵黄粉末（以下抗HP卵黄粉末という）470gを得た。噴霧乾燥の条件は、送風温度145℃排風温度85℃で行った。

【0018】(b) ヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する卵黄水溶性蛋白粉末の調製

凝集抗体価で320以上の鶏卵1kgより分離した卵黄を440g、ホモミキサーで均質化した。この卵黄液に4倍量のλ-カラギナン水溶液（1.5mg/ml）を混和した。この液を室温で30分間放置した遠心分離

（10,000×g、10分間）で卵黄リボ蛋白を、沈殿として分離した。上清をろ紙（アドベントック東洋、No.2ペーパーフィルター）でろ過した。ろ液を分画分子量30,000の限外ろ過膜を用い、10倍に濃縮した後、凍結乾燥しヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する卵黄水溶性蛋白粉末（以下抗HP卵黄水溶性蛋白粉末という）22gを得た。

【0019】(c) ヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する精製鶏卵抗体の調製

10 卵黄水溶性蛋白粉末の調製工程で得られた、卵黄水溶性蛋白画分（21）に終濃度10mMとなるようにリン酸2ナトリウムを溶解し、3N塩酸を滴下しpH8.0とした。あらかじめ10mMのリン酸緩衝液（以下PBという）pH8.0で平衡化した陰イオン交換樹脂（DEAE-セファセル：ファルマシア社製）カラム（300ml）へ、pH8.0に調製した卵黄水溶性蛋白溶液をアプライし、非吸着成分を、平衡化緩衝液で洗浄した。次に100mM PB pH8.0で吸着成分を溶出した。溶出液に対し、終濃度15%（w/v）となるよう硫酸ナトリウムを加え、室温で30分間攪拌した後、10,000×g、10分間の遠心分離で塩析物を集めた。塩析物を10mM PB pH8.0に溶解し、同様の塩析操作をさらに2回繰り返した。最終的に得られた塩析物を10mM PB pH8.0に溶解し、10mM PB 8.0に対し透析後、凍結乾燥し、ヘリコバクター ビロリに対する特異抗体を含有する精製鶏卵抗体（以下抗HP精製鶏卵抗体という）1.2gを得た。得られた抗HP精製鶏卵抗体は、SDS-電気泳動による純度検定において、鶏卵抗体のH鎖、L鎖の2本のバンドのみが検出された。

【0020】＜各種調製サンプルの凝集抗体価＞抗HP全卵粉末、抗HP卵黄粉末、抗HP卵黄水溶性蛋白粉末を、それぞれ50mg/mlとなるように、抗HP精製鶏卵抗体は5mg/mlとなるように、PBS（pH7.4）に溶解し、ろ紙（No.2ペーパーフィルター）でろ過した。ろ液についてマイクロタイター法に従い、ヘリコバクター ビロリに対する凝集抗体価を求めた。各サンプルの抗体純度及び凝集抗体価を表2に示す。抗体純度は、粉末重量に対する鶏卵抗体重量（%）で示した。

【0021】

【表2】

各種飼料サンプルにおける鶏卵抗体価

各種飼料サンプル	抗体価(%)	鶏卵抗体価
コントロール全卵粉末(1)	0.6	>20
抗HP全卵粉末	0.6	320
コントロール卵黄粉末	1.2	>20
抗HP卵黄粉末	1.6	640
コントロール卵黄水溶性蛋白粉末	10.5	>20
抗HP卵黄水溶性蛋白粉末	10.4	2,560
コントロール飼料鶏卵抗体	95.7	>200
抗HP飼料鶏卵抗体	96.5	25,600

(1) コントロール：市販鶏卵から飼料したもの

【0022】＜胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品の調製＞下記の組成よりなる胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品を、70℃以上の過度の加熱あるいは酵素分解による抗体の失活がおこらぬよう、抗HP全卵粉末、抗

HP卵黄粉末または抗HP卵黄水溶性蛋白粉末等の添加時間を考慮し、通常の製造方法により調製した。

(1) 胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防アイスクリーム 30 の処方例

	処方A	処方B
無塩バター	7.0%	7.0%
全脂脱乳	10.0%	10.0%
牛乳	35.0%	35.0%
脱脂粉乳	0.5%	3.0%
グラニュー糖	4.0%	4.0%
75%ブリークス氷あめ	14.0%	14.0%
乳化安定剤	0.5%	0.5%
抗HP卵黄粉末	3.0%	—
抗HP卵黄水溶性蛋白粉末	—	0.5%
水	26.0%	26.0%
香料	適量	適量

(2) 胃炎、胃潰瘍または十二指腸潰瘍予防ヨーグルト

の処方例

	処方A	処方B
牛乳	98.0%	98.0%
脱脂粉乳	0.5%	3.0%
抗HP卵黄粉末	3.0%	-
抗HP卵黄水溶性蛋白粉末	-	0.5%
水	0.5%	0.5%

【0023】試験例1. ムチンへの接着阻害試験
 ヘリコバクター ビロリの調製は実施例1と同様の方法で行った。ヘリコバクター ビロリのコロニーを集め、10mM PB pH7.4で洗浄した。遠心(3000×g, 10分間)して集めた菌を再び10mM PB pH7.4に懸濁し、1ml当り 2×10^2 CFUにした。0.2%豚胃粘膜ムシン(Sigma社製)溶液でコーティングされた24穴ポリスチレンプレートに、菌液と実施例1の抗HP精製鶏卵抗体(1mg/ml)または、菌液と市販の鶏卵から精製したコントロール鶏卵抗体(抗体純度98%) (1mg/ml)の混液各1mlを加えて1時間インキュベートし、生理的食塩水で洗浄後、プレートに残存するヘリコバクター ビロリの菌数を、同菌が産生するウレアーゼを測定することにより算定した。ウレアーゼの活性は単位時間に生成するアンモニア量をインドフェノール法により波長557nmの吸光度(557nm)として求めた。コントロールとして抗HP精製鶏卵抗体の代わりに、牛血清アルブミン(BSA: 1mg/ml)を菌液に加えた。コントロールを100としたときの測定結果を表3に示す。

10 【0024】

【表3】

ヘリコバクター ビロリのムチンへの接着阻害試験

試 料	残存回数(%)
B S A	100
抗HP精製鶏卵抗体	17
コントロール鶏卵抗体	93

20 【0025】

【発明の効果】本発明の胃炎、胃または十二指腸潰瘍予防食品は人体にとって安全であり、これを食することにより、ヘリコバクター ビロリの感染による胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の発症を予防することができ、このことにより健康の維持を図ることができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

A61K 39/40

識別記号

ACL

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(72) 発明者 西元 勝也

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 金 武△祐▽

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 山本 武彦

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72) 発明者 中嶋 睦安

東京都町田市南大谷912-51